

陈佩惠 周述龙 主编

科学出版社

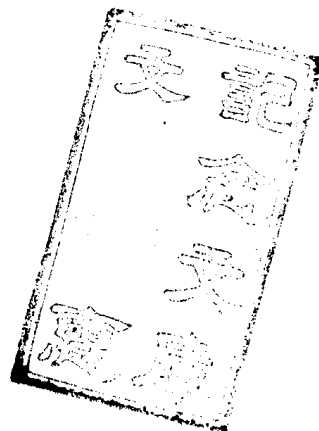
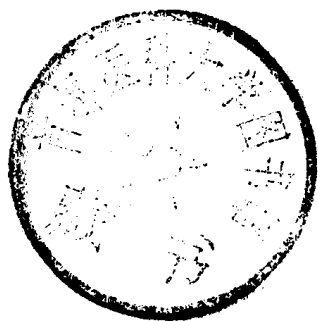
医学寄生虫 体外培养

552-33
224

21730127

医学寄生虫体外培养

陈佩惠 周述龙 主编



A0279787

科学出版社

1995

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

寄生虫体外培养是近代寄生虫学重要实验手段之一。本书系统介绍了我国重要人体与家畜病原寄生虫体外培养技术,由国内从事这方面工作的专业人员,结合我国实际,吸取国外经验编写而成。

全书分概论与各论二部分。概论以专题形式介绍有关理论内容;各论则根据原虫与蠕虫不同虫种具体介绍实际操作,包括培养基配制、培养条件及观察指标等。

本书可供从事医学与兽医寄生虫学研究的工作者、生物学有关学科的教师、研究生及专业人员参考。

医学寄生虫体外培养

陈佩惠 周述龙 主编

责任编辑 何伟华

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

新蕾印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1995年5月第一版 开本: 787×1092 1/16

1995年5月第一次印刷 印张: 28

印数: 1—700

字数: 664 000

ISBN 7-03-004060-0/Q·488

定价: 35.00 元

编写人员名单

主 编 陈佩惠 首都医科大学

周述龙 湖北医学院

编著者 (按姓氏笔画为序)

马衍忠	天津农学院
王祥生	中国人民解放军农牧大学
王国秀	华中师范大学
孔繁瑶	北京农业大学
方 元	南京军区军事医学研究所
石梦辉	首都医科大学
卢思奇	首都医科大学
刘尔翔	中国协和医科大学
刘 多	湖南医科大学
任佩锋	中国科学院上海生物化学研究所
朱兴全	兰州中国农业科学院兽医研究所
陈佩惠	首都医科大学
陈金富	福建医学院
陈曲候	华中师范大学
沈静德	第一军医大学
连维能	上海医科大学
李 杰	大连医学院
李慧珠	首都医科大学
李靚如	天津农学院
李 瑛	湖北医学院
严汉英	南京药物研究所
肖树华	中国预防医学科学院寄生虫病研究所
吴德恒	南通医学院
张敏如	西安医科大学
张述义	上海市寄生虫病防治研究所
张西臣	中国人民解放军农牧大学
杨 彬	南京药物研究所

周述龙	湖北医学院
周肇西	四川省医学科学院寄生虫病防治研究所
周慰祖	湖北省医学科学院
林建银	福建医学院
罗仲金	华西医科大学
罗树宏	湖南医科大学
郑思民	上海市寄生虫病防治研究所
练炳生	湖北医学院咸宁分院
赵郁光	江苏省寄生虫病防治研究所
段义农	南通医学院
聂文清	大连医学院
殷佩云	北京农业大学
徐克继	上海第二医科大学
徐大刚	遵义医学院
逢春积	军事医学科学院微生物流行病学研究所
索 勋	北京农业大学
黄先翔	四川省医学科学院寄生虫病防治研究所
梅柏松	湖北医学院
韩 谦	北京农业大学
鲍学纯	华东师范大学
蓝明扬	江苏省寄生虫病防治研究所
薛长贵	河南医科大学

审定者

王正仪	北京热带医学研究所
赵慰先	南京医学院
刘尔翔	中国协和医科大学
何毅勋	中国预防医学科学院寄生虫病研究所
潘李珍	首都医科大学
薛燕萍	北京热带医学研究所

前 言

在医学寄生虫学与人畜寄生虫病防治斗争中,如何“知彼”是个方法学问题。体外培养是仿效宿主机体内环境的人为的方法,在“知己”的条件下,观察和认识寄生虫的规律而“知彼”,成为战胜寄生虫病的手段之一。随着近代细胞组织培养技术不断发展与提高,寄生虫体外培养的研究也进行了一个世纪,从理论与实际应用上取得新进展。寄生虫体外培养研究的意义不仅在于可能提供大量病原作为了解寄生虫生物学及生理生化特性的研究材料,而且也为寄生虫病的病理学、免疫学、药理学及预防医学等的研究开辟新的途径。

我国科学家从本世纪30年代开始从事寄生虫体外培养的研究。近20年研究发展很快,涉及医学与兽医学领域,内容十分丰富。本书以引起我国人畜寄生虫病的病原寄生虫为主,其中以锥虫、球虫、疟原虫、血吸虫、丝虫等为重点,组织全国30个单位的专业人员共同编写。本书大部分内容主要为作者实践的经验总结。其目的在于介绍更切合我国实际的研究经验,吸收国外先进技术,互相交流,促进学科发展,为寄生虫病防治服务,提供参考。

本书分概论和各论两部分。概论以专题形式阐述寄生虫体外培养的历史发展、应用、实验室基本条件及冷冻技术原理等知识。各论着重叙述各虫种的体外培养技术,力争理论与实际结合,便于读者需要选用。

在组织编写过程中,除编写组成员积极合作、辛勤耕耘外,他们所属单位领导也在时间与其他条件上予以大力支持;我们特别邀请寄生虫学老前辈王正仪教授在百忙中为本书撰写序言及审阅线虫部分,并蒙赵慰先教授审阅概论的各专题,刘尔翔教授审阅疟原虫,何毅勋教授审阅血吸虫,方元教授审阅部分动物原虫、潘李珍副教授审阅蚊、蝇细胞培养,薛燕萍副教授审阅阿米巴和滴虫等章节。他们为本书修改做了大量的工作,提出许多宝贵意见;首都医学院领导拨出专款,解决部分出版资金问题。对上述同志们的热情支持,特表示衷心感谢。

寄生虫体外培养涉及学科领域甚广,同时由于参写者较多,在学术观点、资料的取舍及写作风格上难以一致,疏漏之处,希请读者批评指正。

陈佩惠 周述龙

1993.11.25于北京

序

寄生虫的体外培养,是一项极其重要的技术。它可以推动寄生虫学工作者对寄生虫和寄生虫病作更深入的研究,以获得对之更全面的理解。国外除有培养许多寄生虫虫种(株)的报道外,也有些介绍这项技术的专著。我国虽有不少学者也曾在这方面作了不少工作,然而目前还缺乏一本可供参考的专著。陈佩惠教授和周述龙教授及其同事,曾分别在疟原虫的蚊期体外培养和日本血吸虫尾蚴至产卵成虫的体外培养上作出了很有价值的贡献。现在他们在其自身丰富经验的基础上,邀请国内从事医学寄生虫体外培养的研究工作者,将各自的经验汇集起来,撰成本书,如此全面、系统,在我国堪称创举。

寄生虫体外培养技术,在促进寄生虫学的发展上,有多方面的意义。

1. 无论以形态学为主的经典寄生虫学还是以分子生物学为基础的现代寄生虫学,寄生虫的生活史,总是本学科最基本、最重要的内容。有些寄生虫的发育,或其发育的某个或某几个阶段,是在一个或几个宿主的体内进行的。从一种动物体内探测另一种动物的发育情况,常常只能是间接的、片面的,有时几乎是不可能的。尽管我们可以借动物解剖、尸体检验、驱虫治疗、动物实验等手段察知其中的某些环节的发育情况。然而,要详尽地、连续地、直接地观察虫体的每一发育阶段的全部发育情况,则唯有体外培养,包括每一发育阶段的成功培养,才可以进行最可靠的观察,从而大大丰富生活史的知识。

2. 寄生虫在每一发育阶段都有相应的生理、生化变化。这些变化也是寄生虫学的基本知识。对这类变化的了解,就更须借助于寄生虫的体外培养了。

3. 寄生虫或寄生虫病的免疫学,是现代寄生虫学的一个重要组成部分。要了解寄生虫病的发病机理,要探寻简便易行、灵敏可靠的诊断寄生虫病的方法,要制备高价的寄生虫单克隆抗体等等,都离不开这一组成部分。然而,免疫学的实验研究,需要有纯净的寄生虫抗原。寄生虫的体外培养,尤其是没有细菌或其他生物污染的纯培养,是可以提供大量高纯度抗原的最佳途径。

4. 寄生虫的体外培养,可为筛选治疗寄生虫病的有效新药提供方便的实验手段。

5. 寄生虫虫种或虫株的鉴定,有时是很困难的,特别在种或株之间的形态学差别很小的时候。在这种情况下,利用寄生虫培养技术,结合遗传学、遗传工程或分子生物学,进行适当的实验性研究,很可能有助于问题的解决。

以上所举五端,只不过是寄生虫体外培养方面科学意义及应用价值中之荦荦大者、要者而已。其他还有许多方面的意义,可散见本书之各有关章节中,这里就不再赘述了。

我和陈、周二教授相识已久。他们的钻研精神和严谨的科学作风,我是熟知的。书中的许多其他作者,有的是我过去的学生,有的是我过去或现在的同事,有的是相识甚久的朋友,有的是后起之秀。现在能有机会读到他们的新著,获益良多之余,更感到无比高兴和不胜为他们庆幸。谨略志数语,聊表我向他们的衷心祝贺。

王正仪

1991年11月22日

目 录

第一篇 概论

第一章 寄生虫体外培养的历史发展与展望	(1)
第一节 引言	(1)
第二节 寄生虫体外培养方法的发展	(2)
第三节 寄生虫体外培养的现状与展望	(4)
第二章 寄生原虫体外培养在实验研究中的应用	(8)
第一节 在原虫生物学研究中的应用	(8)
第二节 在原虫病病理与免疫学研究中的应用	(9)
第三节 在抗原虫药物学研究中的应用	(11)
第三章 蠕虫体外培养在抗蠕虫药物研究中的应用	(15)
第一节 研究药物作用的特性	(15)
第二节 杀虫作用机制的研究	(17)
第三节 其他	(19)
第四章 体外培养在吸虫生理生化研究中的应用	(25)
第一节 吸虫代谢	(25)
第二节 体被生化	(30)
第三节 吸虫神经肽	(31)
第四节 吸虫信号传导途径	(33)
第五章 体外培养蚊细胞的生物化学及分子生物学研究	(37)
第一节 蚊细胞的生物化学研究	(37)
第二节 蚊细胞的分子生物学研究	(42)
第六章 寄生虫体外培养的基本条件	(47)
第一节 实验室设备及器材	(47)
第二节 清洗与消毒	(48)
第三节 培养用液的制备	(51)
第四节 培养基的制备及保存	(56)
第七章 寄生虫冷冻保存	(58)
第一节 目的和意义	(58)
第二节 冷冻保存原理和低温损伤机理	(58)
第三节 防止冷冻损伤的方法	(60)

第四节	设备	(61)
第五节	冷冻保存的方法与步骤	(62)
第六节	寄生虫冷冻保存效果的检测	(63)
第七节	今后研究设想和展望	(66)

第二篇 各 论

第一章	阿米巴体外培养	(68)
第一节	溶组织内阿米巴的体外培养	(68)
第二节	致病性自由生活阿米巴的分离与培养	(74)
第二章	蓝氏贾第鞭毛虫体外培养	(79)
第三章	毛滴虫体外培养	(90)
第一节	阴道毛滴虫的体外培养	(90)
第二节	人毛滴虫的体外培养	(96)
第四章	锥虫体外培养	(104)
第一节	唾传锥虫血流型的体外培养	(104)
第二节	唾传锥虫昆虫型的体外培养	(132)
第三节	粪传锥虫体外培养	(147)
第五章	疟原虫体外培养	(172)
第一节	疟原虫红细胞外期体外培养	(173)
第二节	疟原虫红细胞内期体外培养	(185)
第三节	恶性疟原虫配子体的体外培养	(199)
第四节	疟原虫蚊期的体外培养	(206)
第六章	牛巴贝西虫体外培养	(225)
第七章	环形泰勒虫裂殖体体外培养	(232)
第八章	球虫体外培养	(238)
第九章	弓形虫体外培养	(252)
第十章	牛贝诺孢子虫体外培养	(257)
第十一章	卡氏肺孢子虫体外培养	(261)
第十二章	隐孢子虫体外培养	(267)
第十三章	血吸虫体外培养	(272)
第一节	血吸虫体外培养研究的发展	(272)
第二节	培养基与培养条件	(273)
第三节	日本血吸虫与曼氏血吸虫的体外培养技术	(277)
第四节	血吸虫体外培养存在的问题与展望	(294)
第五节	血吸虫冷冻保存技术	(295)
第十四章	布氏姜片吸虫体外培养	(302)
第十五章	吸虫囊蚴体外培养	(305)
第一节	概述	(305)
第二节	卫氏并殖吸虫囊蚴体外培养	(309)

第三节	肝片吸虫囊蚴体外培养	(310)
第四节	宫崎并殖吸虫和大平并殖吸虫囊蚴的体外培养	(313)
第五节	吸虫囊蚴体外培养在分类上的应用	(314)
第十六章	棘球绦虫体外培养	(320)
第一节	细粒棘球绦虫体外培养	(320)
第二节	多房棘球绦虫体外培养	(322)
第三节	讨论	(324)
第十七章	钩虫体外培养	(328)
第十八章	犬弓首线虫幼虫体外培养	(338)
第十九章	丝虫体外培养	(343)
第一节	概述	(343)
第二节	丝虫各发育阶段的体外培养	(349)
第三节	丝虫冷冻保存技术	(356)
第二十章	旋毛虫体外培养	(363)
第二十一章	圆线虫体外培养	(370)
第二十二章	指形丝状线虫和唇乳突丝状线虫体外培养	(380)
第二十三章	索科线虫体外培养	(383)
第一节	引言	(383)
第二节	武昌罗索线虫的体外培养	(383)
第三节	食蚊罗索线虫的体外培养	(386)
第二十四章	寄生虫细胞的培养	(389)
第一节	血吸虫细胞的培养	(389)
第二节	猪囊尾蚴细胞的培养	(391)
第三节	棘球绦虫绦绦期细胞的培养	(392)
第四节	螺类细胞体外培养	(393)
第五节	蜱细胞体外培养	(399)
第六节	蚊细胞的培养	(413)

第一篇 概论

第一章 寄生虫体外培养的历史发展与展望

第一节 引言

寄生虫体外培养的历史发展与现代应用涉及范围广泛,内容极为丰富。模拟寄生虫寄生内外微环境,尤其是内环境的理化条件是寄生虫体外培养的关键。因此,研究寄生虫体外培养环境条件成为寄生虫体外培养的中心内容。为此特对这方面的研究作一个初步的回顾与评述。

寄生虫体外培养的研究是在组织培养技术基础上发展起来的。而组织培养技术是从上世纪所用某些胚胎学技术发展而来。1885年, Roux 以温盐水保存鸡胚髓板的活力达数日之久,可算是第一次将组织块移植成功的例子。1887年, Arnold 以赤杨的髓质小块包埋于蛙体内,当此小块被白细胞浸润后,取出置于温盐水中,观察到细胞的游走,并且能短时存活,说明离体的动物组织或细胞在有利条件下能存活较长时间(向近敏、朱宝莲,1965)。由于培养方法、培养基和培养条件不断改进和提高,促进了体外培养技术在有关学科如细胞学、形态发生学、生理学、微生物学、病毒学和寄生虫学中的应用,呈现出它特有的作用。

最早用人工培养方法培养的是自由生活的和兼性寄生蠕虫(周述龙,1980)。19世纪 Roffredi 用淀粉和醋酸在泥土中培植了大量自由生活的线虫。Kopsch(1919)在沙土中培养寄生在蚯蚓体内兼性寄生杆线虫 *Rhabditis pellio*。Fülleborn(1924)创用粪与活性炭培养线虫自由生活期的幼虫(Hoeppli et al., 1938)。上述三个事例,在当时条件下,不仅是由于虫源易得,虫体大,重要的是易于着手用人为的手段,创造了有利虫体延长生命甚至繁殖的环境条件,为专性寄生虫建立原始的体外培养模式提供有益资料。

专性寄生蠕虫方面,根据 Coutelen(1927)的资料,Lönnberg(1892)与 Tower(1900)曾应用人工培养基使绦虫在离体情况下存活数日之久。另一学者 Meier 多次更换培养基,可将鱼类的某些吸虫和绦虫离体而延长生命达 21 天(Lee and Chu, 1935)。

最早进行专性寄生原虫体外培养的 Novy 与 MacNeal(1903,1904)将非洲马、骆驼等大型家畜寄生虫布鲁斯氏锥虫 *Trypanosoma brucei brucei* 用血琼脂进行了体外存活的研究。这种寄生虫与非洲人体睡眠病病原冈比亚锥虫 *T. gambiense*、罗德西亚锥虫 *T. rhodesiense* 在形态学上不能区别,它们的生活史也十分相似。Rogers(1904)首次从利什曼病人抽取脾髓标本置于生理盐水中,使病原体从无鞭毛型(amastigotes)转变成前鞭毛型(promastigotes)。4年之后, Nicolle(1908)用培养锥虫的血琼脂培养利什曼原虫获得

成功。所谓传统的三 N 培养基(Novy-MacNeal-Nicolle culture medium)是以琼脂、氯化钠和去纤维蛋白动物血配制而成(Chang and Fish, 1983)。这一发现,不仅说明寄生虫可以在离体情况下存活,而且可以发育;同时更明确地指出利什曼原虫属于鞭毛虫,进一步确定了它在生物界的分类位置(王兆俊、吴征鉴,1956)。

本世纪 20 年代至 50 年代之间,细胞与组织培养技术研究蓬勃发展。这时期有关这方面的专著就有 20 余种(向近敏、朱宝莲,1965)。60 年代以后,寄生虫学领域突出的著作有 Taylor 与 Baker(1968,1978,1987)的《寄生虫体外培养的方法》、Silverman 与 Hansen(1971)的《寄生蠕虫体外培养的方法》、北京第二医学院寄生虫教研组译(1984)的《热带病原的体外培养》及 Smyth(1990)的《寄生性蠕虫体外培养》。在我国有沈沁汶、郎所编译(1987)的《寄生原虫和蠕虫的体外培养》一书问世。一些专业期刊杂志,以“体外培养”专栏形式刊登这方面文章。足见体外培养已经成为现代寄生虫学研究的重要手段。

“in vitro”一词来自拉丁文,意即在试管中(in a test tube),过去培养系统所用液体或固体培养基均在玻璃器皿中进行,而现代虽然多为塑料器皿所取代,但仍沿用此词,指体外培养或离体培养,以区别它的反义词“in vivo”。后者亦为拉丁文,意为载体或在活的机体中(in living organism),在寄生虫学一般指在宿主体内。体外培养是模拟宿主内环境的理化因素与条件在宿主以外的情况下对寄生虫进行培养,发挥体外培养的优势,利用在“已知”、“可控”的因素与条件,“直观”地研究寄生虫生活行为、生长、繁殖等的过程。但是,也存在着它的难点,要搞清宿主体内理化因素与条件亦非易事。

第二节 寄生虫体外培养方法的发展

一、体外培养的场所

体外培养方法的建立初期,可能是经过利用与宿主相同或相似的场所进行试验,逐步建立比较完善的体外培养系统。异位(ecto-site)寄生可以给以启示,把血吸虫成虫通过外科途径接种到兔子的眼前房,通过晶体与角膜观察血吸虫生活状态(陈德蕙,1955)。这种异位“in ecto”的转移是让寄生虫离开宿主正常寄居场所,异位寄生在另一场所,那里理化条件和无菌状态有利于寄生虫生存。其次,可以利用不同宿主机体无菌和相应理化条件来培养寄生虫。应用鸡胚(chick embryo 或“in ovo”)培养微生物(如细菌、立克次氏体、病毒等)已广泛开展,1958 年开始用于原虫培养(Pipkin and Jensen,1958),并且发展很快。蠕虫利用鸡胚培养在近 20 年有较大的发展(Fried and Stableford, 1991)。鸡胚培养的好处除了其自然无菌和营养物质丰富外,具有自然非特异性质(unspecialized nature),可供多种生物生长的需要。况且,鸡胚准备简单、廉价,技术上易于掌握。在总结上述实验的同时,人们着手完全摆脱宿主机体,离体或体外培养寄生虫。这是本书介绍的主要内容,它的概念已如上述。必须指出,为了验证体外培养所得虫体的生理功能、繁殖能力等特点,将培养寄生虫再次接种到正常发育的宿主体内。这种体内外结合方式在寄生虫体外培养已屡见不鲜。Basch 等(1974,1977,1981)在研究曼氏血吸虫时用这种方法以检验所培养的母胞蚴、尾蚴及童虫分别转种到中间宿主或终宿主体内以后的继续发育与生

殖能力,评估体外培养方法所存在的问题。

二、培养基的应用

培养基是体外培养最重要的因素。各种寄生虫及寄生虫不同阶段的需求不一,所用培养基也不同,总体来说包括各种盐溶液、缓冲系统、天然培养基及合成培养基等。本书对此均作了详细介绍。这里仅就天然培养基和合成培养基的利用、仿效和发展作一个扼要的说明。

(一) 天然培养基

天然培养基富含天然的养分供寄生虫营养。现代寄生虫体外培养所用培养基中,有很大一部分仍然利用天然培养基作为培养或辅助培养的成分。

天然培养基分为三大类,即①凝固剂。如血浆凝块,供细胞或组织培养的支架。一般用的是禽类血浆。②动物体液。最常用而且很重要的是动物血清,它的主要营养成分是大分子蛋白质及其结合物。常用的血清有小牛、胎牛、马及人的血清等。其次是利用动物脏器腔隙中的体液,如牛胚的羊水、腹水、胸水、眼房水等均为良好天然培养基。③组织浸液。直至如今,仍有很大部分寄生虫体外培养广泛使用各种动物、各种脏器或组织浸液,特别是胚胎浸液为培养基重要的原料。已经证明,胚胎浸液中最主要成分是小分子化合物,而后者可用氨基酸来代替。随着合成培养基的发展,势必逐步取代天然培养基。

(二) 合成培养基

虽然含有天然成分的培养基仍广泛应用,但是这种培养基有很明显的缺点,特别是其中的成分不清楚,且有差异,因而不能保持试验结果的一致性。合成培养基是由对完整动物的生存和发育所必需和有价值的代谢产物混合制成的。理想的培养基应当是由明确组成的化学物质混合而成。由于寄生虫种类繁多,需求不一,目前还没有合成一种万能的培养基。

合成培养基,包括无机盐所构成的平衡液,是一切合成培养基的基础。例如林氏、台氏、亨氏液是最常用的平衡液。为了使寄生虫能够较长期生存在培养基中,必须在平衡液的基础上加入氨基酸、辅酶、维生素或其他具有特殊功能的添加剂。为了抗污染,须加入某些抗生素。目前,应用于细胞或组织培养的合成培养基种类很多,这些培养基,多数也能适用于寄生虫的培养。最常用的合成培养基有 TC 199、NCTC 109、Eagle 及 RPMI 1640 等。

三、寄生虫体外培养与其他种类生物细胞培养的关系

寄生虫体外培养在选用合成或天然培养基的同时,还要考虑是否需要与一种或多种

生物细胞一起培养的问题。这可能是由于寄生虫代谢中某些酶类物质,或代谢中间产物依赖其他生物细胞提供,或在培养系统中缺乏某些启动因子所致。

寄生虫在没有其他具有代谢能力的生物细胞参与下培养称之为纯培养(axenic culture)。axenic 为希腊文,从字义上指无外来生物同时存在(free from a stranger)。寄生虫与另一种生物细胞一起培养为单一生物细胞培养(monoxenic culture),如此类推有两种生物细胞培养(dixenic culture)、多种生物细胞培养(polyxenic culture)等;寄生虫与多种生物细胞及未知因素混杂培养为混合培养(xenic culture) (Diamond, 1983)。

寄生虫在有或无其他生物细胞一起培养发展过程以内阿米巴 *Entamoeba* 体外培养最具代表性。

1. 混合培养

早在 1925 年 Boeck 与 Drbohlav 建立了一种有趣的培养溶组织内阿米巴的方法,即将粪便加入全蛋制成斜面,覆盖以洛氏液(Locke's Sol.)与血清(LES)或蛋白(LEA)的双相培养基,用以培养肠滴虫与阿米巴。阿米巴在有大量细菌群落情况下生长。后来 Dobell 与 Laidlaw 在上述培养基基础上改进,并加入米粉,出现大批阿米巴生长繁殖并形成包囊。可溶性碳水化合物(米粉)在培养基中为细菌所利用,促进了阿米巴生长与繁殖,这种方法多用于从病人分离病原及实验室长期保种。

2. 单一生物细胞培养

这种方法的建立主要是探讨阿米巴与同培养的细胞的相互关系,为进一步建立纯培养。Rees 等(1941—1942)发现一种 G⁻微生物 *Clostridium perfringens* 能够支持溶组织内阿米巴生长。Phillip 所作的克氏锥虫 *Trypanosoma cruzi* 及以后许多学者所作的其他锥虫与阿米巴作单一生物细胞培养均取得成功。

3. 纯培养

Stoll 曾使用复杂单相液体培养 *Entamoeba invadens*。这种阿米巴虽与医学无关,但使培养溶组织内阿米巴得到启发。溶组织内阿米巴的纯培养是 Diamond(1961)建立的。他采用了血清肉汤、维生素、鸡胚浸液覆盖琼脂斜面的双相培养基。这种培养基具有较低氧化还原电位差和提供能被阿米巴吞噬的营养琼脂的优点。

寄生虫体外培养与其他生物细胞一起培养的演变是从混合培养、与其他生物细胞一起培养,发展至无生物细胞的纯培养。培养基的选择从天然培养基至合成培养基结合,最终达到应用合成培养基。

第三节 寄生虫体外培养的现状与展望

通过前人的努力及时代科学发展,特别是商业标准培养基的出售,无菌一次性塑料器皿的供应,广谱抗生素的应用,寄生虫体外培养有了新的发展。尽管现已进行寄生虫体外培养研究的种类很有限,已进行研究种类中也多停留在其生活史中某一阶段,但所获

的知识,应用在医学或兽医学,特别是免疫生物学和化学治疗学已显示它的意义。Smyth (1990)概括有以下6个方面。

- (1) 取代动物宿主或中间宿主的感染,为实验室进行常规保种工作。
- (2) 可供寄生虫幼虫鉴定,成为分类的工具。
- (3) 免疫生物学的研究,特别在疫苗及神经生物学的研究。
- (4) 对寄生虫的生物化学和生理学的深入了解。
- (5) 药物试验。
- (6) 作为生物模型观察细胞与组织的分化。

寄生虫体外培养虽然取得进展,但是工作比较艰巨,除了包括消毒无菌环节多、培养周期长特点以外,尚有很多条件的限制。综合 Silverman 与 Hansen (1971) 及 Smyth (1990) 对蠕虫体外培养必须解决的问题,介绍如下。

(1) 现已进行的体外培养寄生虫种类仅是其中很少的一部分。寄生原虫体外培养较蠕虫的多。原虫开展最多的莫过于球虫目。根据 Speer (1983) 统计,球虫目已进行体外培养计 57 种,而尚未进行的有 62 种,还没有包括新种在内。仅极少数寄生虫在体外培养中能够完成生活史全程。在原虫方面有布氏锥虫 (Hill and Hirumi, 1983)。蠕虫方面有牛点状库柏丝虫 *Cooperia punctata* 与微口膜壳绦虫 *Hymenolepis microstoma* (Leland, 1967; Seidel, 1975)。因此,全面系统的经验还是很贫乏。

(2) 模拟寄生内环境,必须对寄居部位,包括肠道、肺、肝、胆管及循环系统的生物化学与生物物理条件作精确了解。寄生虫种类繁多,对宿主及其脏器组织特异性的广狭差别很大。检测这些部位的 pH、 pO_2 、 pCO_2 、Eh、粘度、糖与氨基酸含量、渗透压及主要生理离子浓度等难度较大。

(3) 寄生虫寄生部位广泛,其所需营养范围极广,包括血液、胆汁、粘液、组织、分泌液、细胞、肠内含物等。这些营养物质有时很难以明确成分的培养基取代。无脊椎动物宿主提供营养物质范围更广。有的蠕虫需要某些特殊物质或生长因子,甚至物质物理状态,如液态、固态或颗粒型等都有一定要求,否则影响寄生虫的生长、发育与生殖。吸虫在体外培养不能产出正常而有生命力的卵就是一个例子。种间寄生虫由于宿主不同,营养需求亦异。自绵羊、山羊和骆驼所获的细粒棘球在体外培养可至性的成熟,而来自马的细粒棘球则否。后者所需营养物质目前还不清楚。

(4) 提供启动因子的刺激。许多寄生虫在完成生活史阶段的转变中,除了应有营养的物质之外,还要特供类似宿主某些特定启动因子,促使寄生虫前一阶段向下一阶段转变。例如血吸虫尾蚴转变为童虫需要注射器机械刺激、低温刺激。细粒棘球绦虫要在适宜培养基质才能启动性器官的分化。

(5) 将培养基中代谢物质和有害物质从虫体周围清除十分重要。设置连续灌流培养系统或循环培养系统已成为寄生虫培养学家所关注的问题。

专性寄生虫体外培养研究的开展已将近一个世纪(1903—1993)。如果对上述存在问题加以解决必将对免疫学、药物药理学及遗传学的开发研究十分有利。Smyth (1969) 认为体外培养寄生虫可作“观察生物学基本现象的模型”。如果把体外培养方法标准化,它将成为实验寄生虫学有力的研究手段。Diamond 对寄生虫体外培养的展望这样写道,“也许有朝一日,科学为工艺(art)所取代,精确掌握培养系统的物理化学条件,合理使用合成培

培养基并能及时排除代谢有害物质,那么,体外培养获得虫体就像收成谷物一样自动化”,这样必然促进有关应用学科的发展。

显然,上述所指的寄生虫体外培养是限于寄生虫或寄生虫生活史中某阶段有机体整体而言。有人认为将来的研究或其扩展研究领域必将是寄生虫细胞培养。目前在这方面研究,除极少数寄生虫细胞培养外,几乎还处于空白状态。因此它将成为寄生虫体外培养发展新动向。

(周述龙)

参 考 文 献

- 王兆俊、吴征鉴,1956,黑热病学,人民卫生出版社。
- 北京第二医学院寄生虫教研组,1984,热带病原体的体外培养,人民卫生出版社。
- 向近敏、朱宝莲,1965,细胞与组织培养,上海科学技术出版社。
- 沈沁汶、郎所,1987,寄生原虫和蠕虫的体外培养,华东师范大学出版社。
- 陈德蕙,1955,日本分体吸虫在兔眼前房内的生态,中华病理杂志,1(2): 81—86。
- 周述龙,1980,蠕虫体外培养及在血吸虫研究上的应用,国外医学,3: 97—103。
- Basch, P. F. and Diconza, J. J., 1974, The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni* surface changes in vitro with ultrastructural correlation, *J. Parasitol.*, 60: 935—941.
- Basch, P. F. and Diconza, J. J., 1977, In vitro development of *Schistosoma mansoni* cercariae, *J. Parasitol.*, 63: 245—249.
- Basch, P. F. and Humbert, R., 1981, Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro, III. implantation of cultured worms into mouse mesenteric vein, *J. Parasitol.*, 67: 191—195.
- Chang, K. P. and Fish, W. R., 1983, Leishmania, c. f. Jensen, J. B. (ed), 1983: 111—154.
- Fried, B. and Stableford, L. T., 1991, Cultivation of Hemintns in chick embryos, c. f. Dawes, B. Advance in Parasitology, 30: 108—157.
- Hill, G. C. and Hirumi, H., 1983, African Trypanosomes, c. f. Jensen, J. B. (ed), 1983: 193—219.
- Hoeppli, R., Feng L. C. and Chu, H. L., 1938, Attempts to culture helminths of vertebrate in artificial media, *Chin. Med. J.*, supp. 2: 343—374.
- Jensen, J. B., 1983, In vitro cultivation of protozoan parasites, CRC Press Inc.
- Lee, C. U. and Chu H. J., 1935, Simple technique for studying schistosome worms in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32: 1 397—1 400.
- Lelend, S. E., 1967, In vitro cultivation of *Cooperia punctata* from egg to egg, *J. Parasitol.*, 53: 1 057—1 060.
- Novy, F. G. and MacNeal, W. J., 1903, The cultivation of *Trypanosoma brucei*, A preliminary note. *JAMA.* 41: 1 266. c. f. Jensen, J. B. 195.
- Novy, F. G. and MacNeal, W. J., 1904, On the cultivation of *Trypanosoma brucei*, *J. Infect. Dis.*, 1: 1.
- Nicolle, C., 1908, Nouvelles aquisition sur le Kalaazar, *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 146: 489. c. f. Jensen, J. B. (ed), 1983: 193—219.
- Pipkin, A. C. and Jensen, D. A., 1958, Avian embryos and tissue culture in the study of parasitic protozoa, I. Malarial parasites, *Exp. Parasitol.*, 7: 491—530.
- Rogers, L., 1904, Preliminary note on the development of *Trypanosoma* in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovani bodies of cachectical fever and Kalaazar, *Lancet*, 2: 215. c. f. Jensen, J. B. 1983: 195.
- Seidel, J. S., 1975, The life cycle in vitro of *Hymenolepis microstoma* (cestoda), *J. Parasitol.*, 61: 677—681.
- Silverman, P. H. and Hansen, E. L., 1971, In vitro cultivation procedures for parasitic helminths. Recent advances. c. f. Dawes, B. (ed), Advances in parasitology, Academic Press, 9: 227—258.
- Smyth, J. D., 1969, Parasites as biological models, *Parasitol.*, 59: 73—91.

- Smyth, J. D. , 1990, In vitro cultivation of parasitic helminths, CRC Press Inc.
- Speer, C. A. , 1983, The Coccidia. c. f. , Jensen, J. B. (ed), 1—64.
- Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. , 1968, The cultivation of parasites in vitro, Blackwell, Oxford.
- Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. , 1978, Methods of cultivating parasites in vitro, Acad. Press, London New York San Francisco.
- Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. , 1987, In vitro methods for parasite cultivation, Acad. Press, London.